

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

09/895,517  
4  
49-02

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 33 180.7  
Anmeldetag: 29. Juni 2000  
Anmelder/Inhaber: Carl Zeiss Jena GmbH,  
Jena/DE  
Bezeichnung: Verfahren zur Detektion von Farbstoffen  
in der Fluoreszenzmikroskopie  
IPC: G 01 J, G 01 N, G 02 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. August 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Waasmaier

### Verfahren zur Detektion von Farbstoffen in der Fluoreszenzmikroskopie

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Laser Scanning Mikroskopie, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und der Scanning Nahfeldmikroskopie, zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierenden Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Screening). Durch den Übergang von der Detektion von wenigen breiten spektralen Farbstoffbändern zur simultanen Aufnahme kompletter Spektren eröffnen sich neue Möglichkeiten bei der Identifikation, Separation und Zuordnung der meist analytischen oder funktionalen Probeneigenschaften zu räumlichen Teilstrukturen oder dynamischen Prozessen. Simultan-Untersuchungen von Proben mit Mehrfachfluorophoren werden damit bei überlappenden Fluoresenzspektren auch in räumlichen Strukturen von dicken Proben möglich. Zusätzlich ist es möglich, lokale spektrale Verschiebungen von Emissionsbändern der Farbstoffe zu detektieren und den räumlichen Strukturen zu zuordnen. Die Datenaufnahmerate wird durch die Anordnung nicht verringert.

### Stand der Technik

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, „Handbook of biological confocal Microscopy“; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

Die eingestrahlten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons

Ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur Anregungsstrahlung generell rotverschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlegenden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitische Strahlteiler verwendet.

Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hochenergetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr einem Vielfachen des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflußt, d.h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Vergleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning- Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2 [L 1]).

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptions-eigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto optischen Kristalls Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs (2) beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rasterst punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punkt detektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen an dem die

Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokal n Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descannete Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descannete Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektives in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descannete Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissions-eigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffe gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden. Dazu erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in getrennten Punktdetektoren (PMT x). Eine flexible Anpassung der Detektion und der Anregung an entsprechende neue Farbstoffeigenschaften durch den Anwender ist mit der oben

beschriebenen Anordnung nicht möglich. Statt dessen müssen für jeden (neuen) Farbstoff neue dichroitische Strahlteiler und Blockfilter kreiert werden. In einer Anordnung gemäß DE..... wird das Fluoreszenzlicht mit Hilfe eines Prismas spektral aufgespalten. Das Verfahren unterscheidet sich von der oben beschriebenen Anordnung mit dichroitischen Filtern nur dadurch, dass der verwendete Filter in seiner Charakteristik einstellbar ist. Es werden jedoch weiterhin pro Punkt detektor vorzugsweise das Emissionsband eines Farbstoffs aufgezeichnet.

Überlagern sich die Emissionsspektren zweier Farbstoffe, so stoßen die bisherigen Detektionseinrichtungen an ihre Grenzen. Um ein Übersprechen zwischen beiden Farbstoffen zu vermeiden, muß der spektrale Detektionsbereich eingeschränkt werden. Der Bereich in dem sich die beiden Farbstoffe überlagern wird hierzu einfach herausgeschnitten und nicht detektiert. Somit verschlechtert sich die Effizienz der Detektionseinheit. Ein gleiches Signal- zu Rauschverhältnisses kann nur durch die Erhöhung der Anregungsleistung erzielt werden, wodurch es zu einer Präparatschädigung kommen kann. Deshalb werden heutzutage maximal bis zu 6 verschiedene Farbstoffsonden simultan eingesetzt, da die Farbstoffe sonst aufgrund der sich stark überlagernden Emissionsbänder nicht getrennt werden können.

Bisher wurden Farbstoffe so modifiziert, daß sie sich entweder in ihren Absorptionseigenschaften oder in ihren Emissionseigenschaften voneinander unterscheiden. Fig. 3a) zeigt die Emissionsspektren von verschiedenen typischen Farbstoffen. Aufgetragen ist das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist das sich die mit 1 bis 4 bezeichneten Farbstoffe in der Lage und der Form ihrer Emissionsspektren unterscheiden. Diese Farbstoffe sind jedoch in den meisten Fällen toxisch für Lebendpräparate. Somit sind Untersuchungen zur Evolution von Zellverbänden in Lebendpräparaten unmöglich. Ende der 90er Jahre wurden in der Natur vorkommende Farbstoffe, die sogenannten fluoreszierenden Proteine (GFP, YFP, CFP, TOPAS, GFT, RFP) entdeckt (Firma: Clonotech, USA).

eine derartige Untersuchung mit den Methoden nach dem Stand der Technik nur schwer möglich sind. Zwar werden heutzutage Spektrometer auch in Verbindung mit einem LSM eingesetzt. Hierbei wird statt eines Punkt detektors ein herkömmliches meist hochauflösendes Spektrometer eingesetzt (Patent Dixon, et al. US 5,192,980). Diese können jedoch nur punktuell oder gemittelt über ein Gebiet ein Emissionsspektrum aufzeichnen. Es handelt sich also um eine Art der Spektroskopie. In einer weiteren Anordnung wird die Lebensdauer der Farbstofffluoreszenz gemessen, wodurch wiederum auf die Art der Umgebung geschlossen werden kann. Würde man jedoch ein komplettes Bild aufzeichnen so würde dies eine lange Datenaufnahmezeit erfordern. Deshalb können diese Verfahren nur bedingt bei der Untersuchung von Lebendpräparaten eingesetzt werden.

In einer weiteren Applikation der Fluoreszenzmikroskopie wird die Ionenkonzentration (z.B.:  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{ZN}^+$ , ...) insbesondere in biologischen Präparaten bestimmt. Hierzu werden spezielle Farbstoffe oder Farbstoffkombinationen (z.B. Fura, Indo, Fluo; Molecular Probes, Inc.) verwendet, die eine spektrale Verschiebung in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration besitzen. Abb. 4a) zeigt die Emissionsspektren von Indo-1 in Abhängigkeit von der Konzentration der Kalziumionen. Abb. 4b) zeigt ein Beispiel für die Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Kalzium Ionenkonzentration bei Verwendung der Kombination von FLuo-3 und Fura Red-Farbstoffen. Diese speziellen Farbstoffe werden als Emissionsratiofarbstoffe bezeichnet. Detektiert man wiederum die beiden in Abb. 4a dargestellten Fluoreszenzbereiche und bildet das Verhältnis beider Intensitäten, so kann auf die entsprechende Ionenkonzentration rückgeschlossen werden. Meist werden bei diesen Messungen dynamische Änderung der Ionenkonzentration in Lebendpräparaten untersucht, die eine Zeitauflösung von weniger als einer Millisekunde erfordern.

Gegenstand der Erfindung sind daher neue Methoden zur flexiblen und frei programmierbaren Detektion. Diese Methoden sollen in bildgebenden wie in analytischen Mikroskopiersystemen eingesetzt werden können. Deshalb darf

beim Einsatz dieser Methoden die Datenaufnahmerate nicht verschlechtert werden. Die Mikroskopsysteme sind bildgebende Systeme wie Laser-Scanning-Mikroskope zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen Auflösung bis zu 200 nm, Scanning-Nahfeld-Mikroskope zur hochauflösten Untersuchung von Oberflächen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm, Fluoreszenzkorrelations-Mikroskope zur quantitativen Bestimmung von Molekülkonzentrationen und zur Vermessung von Molekül-Diffusionen. Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen eingeschlossen.

In all den o.g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt. Diese Zielstellungen werden durch Verfahren und Anordnungen gemäß den Patentansprüchen gelöst.

Durch die Erfindung können sich teilweise oder auch vollständig überlagernde Farbstoffe noch getrennt und dabei die oben erwähnten Nachteile bzw. Limitationen der bisher eingesetzten Techniken umgangen bzw. überwunden werden. Multifluoreszenzaufnahmen unter Verwendung von den in der Natur vorkommenden fluoreszierenden Proteinen sind hierdurch möglich. Weiterhin können mit dieser Methode besonders effizient Wellenlängenverschiebungen aufgrund von verschiedenen Umgebungen in den zu untersuchenden Präparaten bestimmt werden.

## Beschreibung der Erfindung

Hintergrund des Verfahrens zur flexiblen Detektion ist eine spektral aufgespaltete Detektion der Fluoreszenz. Dazu wird das Emissionslicht im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe des Hauptfarbteilers (MDB) vom Anregungslicht abgespalten. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in Abb. 5 dargestellt. Das Licht der Probe wird nun mit Hilfe von einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Blende (Pinhole) PH fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannnten Detektion entfällt die Blende. Das Licht wird nun mit Hilfe eines winkeldispersiven Elements DI in seine Spektralanteile zerlegt. Als winkeldispersive Elemente kommen Prismen, Gitter und akusto optische Elemente in Frage. Das vom dispersiven Element in seine spektralen Komponenten aufgespaltete Licht wird im Anschluß auf einen Zeilendetektor DE abgebildet. Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge und wandelt dies in elektrische Signale  $S(\lambda)$  um. Zusätzlich kann der Detektionseinheit noch ein Liniensfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet werden.

Eine mögliche Ausführungsform des optischen Strahlenganges der in Abb. 5 im Blockschaltbild gezeigten Detektoreinheit ist in Abb. 6 dargestellt. Der Aufbau beschreibt im wesentlichen einen Cerny Turner Aufbau. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Blende PH fokussiert. Bei einer nichtdescannnten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel S1 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf ein Liniengitter G, beispielsweise ein Gitter mit einer Linienzahl von 651 Linien pro mm. Das Gitter beugt das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen. Der zweite abbildende Spiegel S2 fokussiert die einzelnen spektral aufgespaltenen Wellenlängenanteile auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor

besitzt 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Der freie Spektralbereich der oben beschriebenen Ausführungsform beträgt etwa 350 nm. Der freie Spektralbereich wird in dieser Anordnung gleichmäßig auf die 32 Kanäle des Zeilendetektors verteilt, wodurch sich eine optische Auflösung von etwa 10 nm ergibt. Somit ist diese Anordnung nur bedingt zur Spektroskopie geeignet. Jedoch ist ihr Einsatz in einem bildgebenden System vorteilhaft, da das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Spektralbandes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung des freien Spektralbereiches kann zusätzlich durch eine Verdrehung beispielsweise des Gitters erfolgen.

Eine weitere mögliche Ausführungsform könnte die Verwendung eines Matrixdetektors (z.B. eine CCD, ...) beinhalten. Hierbei wird in einer Koordinate durch das disperse Element eine Aufspaltung in verschiedene Wellenlängenanteile vorgenommen. In der verbleibenden Richtung auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines Linienscanners (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfookus eine Linie in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Mülzblende. Eine nichtdescannte Detektion bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung erfolgen. Hierzu kann wiederum die konfokale Blende entfallen.

Im folgenden wird der Auswertealgorithmus für die in Abb. 6 dargestellte Anordnung also für einen Punktscanner beschrieben. Der Algorithmus kann jedoch ohne Einschränkung auf die Anordnung für einen Linienscanner angewendet werden.

Wie aus Abb. 3 und 4 ersichtlich ist unterscheiden sich die einzelnen Farbstoffe in der Lage und der Form der Emissionsspektren. Der Algorithmus (Abb. 7) bestimmt pro Bildpunkt die Lage des Schwerpunkts bzw. Maxima des in dem Bildpunkt detektierten Emissionssignals. Im folgenden wird eine

vorteilhafte mögliche Art der Bestimmung des Schwerpunktes näher beschrieben. Andere Arten der Bestimmung des Schwerpunktes bzw. Maxima, wie Interpolationsfits, etc. sind uneingeschränkt Teil der Erfindung.

Die vom Zeilendetektor detektierten Signale pro Kanal (linkes Diagramm) werden dazu mit einer Kalibrierfunktion (rechtes Diagramm) multipliziert, d.h. jeder Kanal erhält eine bestimmte Wichtung. Das linke Diagramm in Abb. 7 stellt beispielhaft ein gemessenes Emissionssignal in Abhängigkeit von der Kanalnummer in dem das Signal detektiert wurde dar. Im rechten Diagramm ist ein Beispiel einer Wichtungsfunktion für die entsprechenden Einzelkanäle in Abhängigkeit von der Kanalnummer aufgeführt.

Die gewichteten Einzelsignale pro Kanal werden nun aufsummiert und durch die Summe der ungewichteten Einzelsignale pro Kanal (**Summensignal**) geteilt. Damit ergibt sich ein Signal, das ein charakteristisches Maß für die Lage des Schwerpunktes des Emissionsspektrums und damit eines angeregten Farbstoffe ist (Abb. 8a). Dieses Signal wird im folgenden **Positionssignal** genannt. Abb 8a zeigt das Positionssignal in Abhängigkeit von der Lage des Schwerpunkts bzw. Maximums des detektierten Emissionsspektrums.

Es können durch die Messung des Positionssignals verschiedene Farbstoffe aufgrund ihrer Lage und Art der Emissionsspektren unterschieden werden. Weiterhin kann bei Verwendung beispielsweise eines Farbstoffes die von der Umgebung abhängige Wellenlängenverschiebung des Emissionsspektrum gemessen werden.

Befinden sich im Bildpunkt gleichzeitig mehrere Farbstoffe so ergibt sich je nach Konzentration des einen Farbstoffs im Vergleich zum anderen Farbstoff eine Linearkombination der Lage des Schwerpunkts nach folgender Gleichung:

$$\text{Position} = \sum_k^n \text{Pos}_k \cdot C_k ,$$

wobei  $\text{Pos}_k$  die charakteristische Lage des Schwerpunkts eines Farbstoffs,  $C_k$  die Konzentration eines Farbstoffs und  $n$  die Anzahl der simultan in dem Bildpunkt angeregten Farbstoffe sind. Der Algorithmus kann somit auch Ionenkonzentrationen bestimmen und zur Detektion eines FRET-Signals

ingesetzt werden. Zusätzlich ist eine Analyse der lokalen Überlagerung von 2 oder mehreren Farbstoffen möglich (Colokalisationsmessung)

Das von der Ionenkonzentration abhängige Signal bei Verwendung von 2 Farbstoffen (z.B. Fluo-3 und Fura Red, Molecular Probes, Inc.) oder von einem Farbstoff mit 2 charakteristischen Emissionsbändern (z.B. Indo, Molecular Probes, Inc.) ist in Abb. 8b dargestellt. Aufgetragen ist das Positionssignal in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration.

Wie bereits erwähnt ist das Positionssignal ein Maß für die Lage des Schwerpunktes des Emissionsspektrums. Es kann also als Maske für eine Berechnung eines farbkodierten Intensitätsbildes dienen. Der Algorithmus ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. Dazu wird im ersten Schritt die Maske (also das Positionssignal) mit einer entsprechenden Lookup Tabelle multipliziert. Die Lookup Tabelle beinhaltet die entsprechende Farbzuzuordnung in Abhängigkeit von der Lage des Schwerpunktes des Emissionsspektrums. Im Anschluß wird das Ergebnis dieser Multiplikation mit dem Intensitätswert (dem Summensignal) multipliziert, also die Helligkeit der Farbe der tatsächlichen Fluoreszenzintensität angepaßt. Je nach Wahl der Lookup Tabelle können farbmaskierte Intensitätsbilder (diskrete Farbverteilung), d.h. pro Pixel kommt nur ein Farbstoff vor oder auch Intensitätsbilder mit Mischfarben durch ein Zusammensetzen der Einzelbildpunkte zu einem Bild erzeugt werden.

Der entscheidende Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass die gesamte Fluoreszenz eines jeden Farbstoffes (das Summensignal) unabhängig von dem Grad der Überlagerung der Emissionsspektren detektiert werden kann und trotzdem die Farbstoffe noch getrennt (durch das Positionssignal) darstellbar sind. Sich stark überlagernden Farbstoffe (Abb. 3c) können somit besonders effizient detektiert werden.

Eine Implementation des Algorithmus in den Aufbau nach Abb. 6 kann digital oder auch analog erfolgen. Beide Anordnungen werden im folgenden näher beschrieben. Eine Anordnung zur digitalen Berechnung des Summen- und des Positionssignals ist in Abb. 10 schematisch dargestellt. Hierbei wird der an den Anoden eines Mehrkanal-PMT fließende Strom, jeweils durch den ersten Amplifier A (als Strom-Spannungswandler geschaltet) in eine

Spannung gewandelt und verstärkt. Die Spannung wird einem Integrator I zugeführt der über eine entsprechende Zeit (z.B. Pixelverweilzeit) das Signal integriert.

Zur schnelleren Auswertung kann dem Integrator I ein Komparator K nachgeschaltet werden, der als einfacher Komparator eine Schaltschwelle hat, die bei Überschreitung ein digitales Ausgangssignal erzeugt oder der als Fensterkomparator ausgebildet ist und dann ein digitales Ausgangssignal bildet, wenn sich das Eingangssignal zwischen der oberen und unteren Schaltschwelle befindet oder wenn sich das Eingangssignal außerhalb (unter oder über) den Schaltschwellen liegt. Die Anordnung des Komparators bzw. des Fensterkomparators kann sowohl vor dem Integrator als auch danach erfolgen. Schaltungsanordnungen ohne Integrator (so genannte Verstärkermodus) sind ebenfalls denkbar. Bei der Anordnung im Verstärkermodus wird der Komparator K auch nach entsprechender Pegelanpassung angeordnet. Der Ausgang des Komparators K dient als Steuersignal für ein Switch-Register Reg, das direkt die aktiven Kanäle schaltet (online) oder der Zustand wird dem Computer über eine zusätzliche Verbindung V mitgeteilt, um eine individuelle Auswahl der aktiven Kanäle zu treffen (off-line). Das Ausgangssignal des Integrators I wird direkt einem weiteren Ampl. A1 zur Pegelanpassung, für die nachfolgende A/D-Wandlung AD zugeführt. Die AD gewandelten Werte werden über geeignete Datenübertragung an einen Rechner (PC oder Digital-Signal-Prozessor DSP) übertragen, der die Berechnung des Positionssignales und des Summensignales nach Abb.7 und 9 durchführt.

Ein auf analoger Datenverarbeitung basierendes Äquivalent der Anordnung in Abb. 10 ist Abb. 11 dargestellt. Die Signale der Einzelkanäle werden hierbei wiederum mit einem Verstärker in Spannungssignale transformiert. Anschließend werden die einzelnen Spannungssignale in einem Integrator I während der Pixelverweilzeit aufintegriert.

Dem Integrator nachgeschaltet ist ein Komparator K der einen Vergleich des aufintegrierten Signals mit einem Referenzsignal durchführt.

Falls das aufintegrierte Signal kleiner als die Komparatorschwelle ist, so würde in dem entsprechenden Einzelkanal kein oder ein zu kleines

Fluoreszenzsignal gemessen. In einem solchen Falle soll das Signal des Einzelkanals nicht weiter verarbeitet werden, da dieser Kanal nur einen Rauschanteil zum Gesamtsignal beiträgt. Der Komperator betätigt in einem solchen Falle über Reg einen Schalter S und der Einzelkanal wird für den gerade gemessenen Pixel ausgeschalten. Mit Hilfe der Komperatoren in Kombination mit den Schaltern wird also automatisch der für den gerade gemessenen Bildpunkt relevante Spektralbereich ausgewählt.

Im Anschluß wird das integrierte Spannungssignal wieder mit Hilfe eines Widerstandes R in einen Strom umgewandelt. Jeder Einzelkanal erzeugt somit einen von der auf den Einzelkanal auftreffenden Fluoreszenzintensität abhängigen Strom. Alle aneinander grenzenden Einzelkanäle werden anschließend mit einem weiteren zwischen ihnen liegenden Widerstand R1 verbunden. Der entstehende Gesamtstrom am oberen und unteren Ende der Detektorzeile wird wiederum mit einem Strom-Spannungswandler A1 in eine Spannung gewandelt. Die Spannung am oberen und unteren Ende Eo und Eu entsprechen der Summe der mit gegenläufigen Geraden gewichteten Signale der Einzelkanäle. Die beiden Signale am oberen und am unteren Ende werden im folgenden mit einem Summationsverstärker SV summiert. Das so entstehende Signal entspricht dem Summensignal der gesamten gemessenen Fluoreszenz. Dieses Summensignal und das Signal vom oberen Ende oder das Signal vom unteren Ende (gestrichelt dargestellt) werden einem analogen Dividierer zugeführt, der am Ausgang das Positionssignal bildet.

Das Summen- und das Positionssignal werden im Anschluß mit jeweils einem Analog-Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt und vom Computer oder DSP weiterverarbeitet. Es können jedoch auch uneingeschränkt das obere und untere Signal gewandelt und vom Computer verarbeitet werden. In diesem Falle würde der Computer das Summensignal und das Positionssignal bestimmen. In beiden Fällen wird der Algorithmus nach Abb. 9 im Computer durchgeführt.

Jedoch kann auch eine Implementierung des Algorithmus nach Abb. 9 in die Schaltung nach Abb. 11 erfolgen. Hierzu werden im folgenden 3 Möglichkeiten näher erläutert. In einer ersten Anordnung erfolgt die Multiplikation mit der Lookup Tabelle durch eine Veränderung der

Widerstände ( $R_1$ ), die sich zwischen den benachbarten Einzeldetectionskanälen befinden. Der Rest der Schaltung bleibt wie Eingangs beschrieben. In zweiten Anordnung erfolgt die Multiplikation mit der Lookup Tabelle im Verstärker ( $A_1$ ). Hierzu wird der Verstärker  $A_1$  mit einer veränderlichen nichtlinearen Kennlinie betrieben. In einer dritten Anordnung (digitale nach Abb. 10 und analoge Detektion nach Abb. 11) erfolgt eine Manipulation bzw. Verzerrung der Eingangssignale der Einzeldetectionskanäle durch: eine Veränderung der Verstärkung von ( $A$ ), eine Veränderung der Integrationszeiten von ( $I$ ), durch ein Einspeisen eines zusätzlichen Offsets vor dem Integrator und/oder durch eine digitale Beeinflussung der gezählten Photonen bei einer Photonenzählanordnung. Alle 3 Methoden können auch beliebig miteinander kombiniert werden.

Für die Vermeidung von Artefakten ist es bei einer Fluoreszenzmessung notwendig das von der Probe rückgestreute Anregungslight zu unterdrücken oder zumindest so stark abzuschwächen das es kleiner als oder in der gleichen Größenordnung wie das Emissionsmaximum ist. Hierzu kann der oben beschriebene zusätzliche Linienfilter oder ein entsprechend optimierter Hauptfarbteiler (MDB) zur optischen Abschwächung verwendet werden. Da die spektrale Breite der Anregungslaserstrahlung sehr viel kleiner als die vom Einzelkanal detektierte Bandbreite ist, kann die rückgestreute bzw. reflektierte Anregungsstrahlung auch durch ein gezieltes Ausschalten des entsprechenden Einzelkanals mit dem in Abb. 11 dargestellten Schalter erfolgen.

Die Anordnung nach Abb. 11 hat gegenüber Anordnung nach Abb. 10 mehrere Vorteile. Der auffälligste Vorteil ist, dass lediglich 2 Kanäle in digitale Daten gewandelt und an den Computer gesendet werden müssen. Dadurch werden die vom Computer zu verarbeitenden Datenraten minimiert. Dies ist besonders wichtig bei der Anwendung des Verfahrens in der Echtzeitmikroskopie bei der beispielsweise mehr als 50 Bilder mit 512x512 Pixeln und 12 bit Pixeltiefe detektiert werden müssen, um die extrem schnell ablaufenden dynamischen Prozesse registrieren zu können. Beim Einsatz

diese Verfahrens ist weiterhin keine Grenzen an die Anzahl der Einzelkanäle des verwendeten Zellendetektor (Matrixdetektors) und damit an die Größe des detektierbaren Spektralbereiches und/oder die spektrale Auflösung des Spektralsensors gesetzt.

Weiterhin sind bei der in Abb. 10 dargestellten Vorrichtung die zu wandeindenden Signalpegel wesentlich kleiner. Dadurch ist das zu erwartende Signal zu Rauschverhältnis geringer.

In den beiden oben beschriebenen Anordnungen zur Umsetzung des Auswertealgorithmus wurde eine Integratororschaltung zur Detektion der Einzelkanalsignale verwendet. Uneingeschränkt kann jedoch auch eine Photonenzählung in den Einzelkanälen erfolgen. Die in Abb. 10 dargestellte Anordnung hat jedoch den Vorteil, dass sie neben dem Positionssignal auch noch die komplette Spektralinformation zur nachträglichen Bildverarbeitung zur Verfügung stellt. Die Erfindung schließt deshalb auch eine Kombination beider Anordnungen ein.

Abb. 12 zeigt Messungen, die mit den in Abb. 10 und 11 dargestellten Anordnungen durchgeführt worden. In Abb. 12a sind die mit einem Spektrometer gemessenen Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe GFP, CFP und DI aufgeführt. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte mit einem Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Diese Farbstoffe wurden im folgenden spezifisch an bestimmte Regionen in einem biologischen Präparat gebracht. Abb. 12b zeigt ein Histogramm des Positionssignals beim Scannen über einen Probenausschnitt an dem sich alle 3 Farbstoffe befinden. Deutlich sind die 3 Maxima im Histogramm zu erkennen an denen die 3 Farbstoffe ihr charakteristisches Positionssignal besitzen. Die Positionen für die 3 Farbstoffe sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Farbstoff	CFP	GFP	DI
Positionssignal (relativer Wellenlängenshift)	14	30	80

Die Farbstoffe sollten sich also ohne weiteres mit den erfindungsgemäßen Anordnungen trennen lassen. Zusätzlich sind lokale Wellenlängenverschiebungen aufgrund der verschiedenen lokalen Umgebungen innerhalb eines Farbstoffes sichtbar. Dies äußert sich in der Breite der Maxima für die einzelnen Farbstoffe im Histogramm.

Abb. 13a zeigt das aus den Summensignalen gebildete Intensitätsbild. In Abb. 13b ist das entsprechende aus den Positionssignalen gebildete Bild. Dieses Bild verkörpert die entsprechenden Schwerpunkte der Emissionsspektren. Deutlich sind die unterschiedlich eingefärbten Zellkerne (teils mit GFP, teils mit CFP gefärbt) und die mit DI gefärbten Zellgerüste unterscheidbar.

Abb. 13c stellt das entsprechend dem Algorithmus in Abb. 9 berechnete farbkodierte Intensitätsbild dar. Die einzelnen Regionen, an denen sich unterschiedliche Farbstoffe anlagerten sind nun durch die Farbkodierung getrennt. Die Trennung wird verdeutlicht durch die Darstellung eines Bildes in seinen 3 RGB Kanälen. Zum Vergleich ist auch ein mittels einer Detektion nach dem Stand der Technik gemessenes Bild in Abb. 13d dargestellt. Hierbei erfolgte die Detektion nur in extrem engen Spektralbändern, um ein Übersprechen der Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Farbstoffe untereinander zu vermeiden. Durch das starke Einengen der Detektionsbänder konnte nur ein Bruchteil des von der Probe emittierten Fluoreszenzsignals gemessen werden. Um ein Bild mit möglichst gleichem Signal zu Rauschverhältnis zu erhalten, mußte die Anregungsleistung um ein Vielfaches erhöht werden. Dies demonstriert die hohe Effizienz der erfindungsgemäßen Anordnungen im Vergleich zu Anordnungen nach dem Stand der Technik. Weiterhin können Regionen in denen sich das CFP bzw. das GFP anlagerten aufgrund der sich überlagernden Emissionsspektren beider Farbstoffe nicht getrennt werden. Dies äußert sich in der gelben Einfärbung dieser Zellregionen bzw. in dem doppelten Erscheinen der Regionen in 2 Bildkanälen (R und G).

## Patentansprüche

1.

Verfahren zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens , vorzugsweise der Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, wobei mindestens ein spektraler Schwerpunkt und/oder ein Maximum der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten Strahlung bestimmt wird.

2.

Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bestimmung des Schwerpunkts und/oder des Maximums der Emissionsstrahlung von Fluorochromen zur: Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt .

3.

Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bestimmung des Schwerpunkts und/oder des Maximums der reflektierten oder transmittierten Anregungsstrahlung von Fluorochromen zur: Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt .

4.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung ortsaufgelöst detektiert wird.  
Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt

5.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte oder transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung ortsaufgelöst detektiert wird.

6.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine spektrale Wichtung zwischen mehreren Detektionskanälen , eine Summation der gewichteten Kanäle der Signale der Detektionskanäle sowie eine Summation der Detektionskanäle erfolgt

7.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewichtet werden, indem sie mit einer Wichtungskurve multipliziert werden, ein Summensignal erzeugt wird, indem die Summe der berücksichtigten Kanäle bestimmt wird und ein Positionssignal erzeugt wird indem die Summe der gewichteten Signale durch das Summensignal geteilt wird.

8.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Wichtungskurve eine Gerade ist

9.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei Signal von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen  
werden und die Wichtung und Summation digital in einem Rechner erfolgt.

10.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Wichtung und Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels  
einer Widerstandskaskade erfolgt

11.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Widerstände einstellbar sind

12.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Wichtungskurve einstellbar ist

13.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der  
Eingangssignale beeinflußt werden

14.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt

15.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt

16.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

wobei das Positionssignal und das Summensignal analog ermittelt , gewandelt und digital ausgelesen werden

17.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei ein oberes und ein unteres Signal, die der Summe der mit  
gegenläufigen Wichtungskurven gewichteten Signale der Einzelkanäle  
entsprechen, ausgelesen, digital gewandelt und dem Rechner zugeführt  
werden.

18.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei das Positionssignal und das Summensignal zur Generierung eines  
Bildes verwendet werden

19.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird

20.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt

21.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei das Positionssignal und das Summensignal mit einer lookup Tabelle  
kombiniert werden

22.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe  
und / oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt

23.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des  
gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer  
Unterschr itung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine  
Veränderung der Betriebsweiser des Detektionskanales erfolgt

24.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen  
Detektionskanals erfolgt.

25.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs  
erfolgt

26.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer  
Integratorschaltung generiert werden

27.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und  
anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

28.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Photonenzählung zeitkorreliert erfolgt

29.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz

30.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im  
Wirkstoffscreening , wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist  
Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
in einem Mikroskop

31.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

32.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in  
einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

33.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels konfokaler Detektion

34.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einer scannenden Anordnung

35.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

36.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

37.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels nichtkonfokaler Detektion

38.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einer scannenden Anordnung

39.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit descannter Detektion

40.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

41.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Punktabbildung

42.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht descannter Detektion

43.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

44.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-  
oder Hellfeldabbildung

45.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

46.

Anordnung zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des  
wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere  
des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens , vorzugsweise der  
Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder  
enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz,  
wobei Mittel zur Bestimmung mindestens eines spektralen Schwerpunktes  
und/oder eines Maximum der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten  
Strahlung vorgesehen sind.

47.

Anordnung nach Anspruch 46,  
wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element  
aufgespalten und in mindestens einer Richtung ortsaufgelöst detektiert wird.

48.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt

49.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte oder  
transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in  
mindestens einer Richtung ortsaufgelöst detektiert wird.

50.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine spektrale Wichtung zwischen mehreren Detektionskanälen , eine  
Summation der gewichteten Kanäle der Signale der Detektionskanäle sowie  
eine Summation der Detektionskanäle erfolgt

51.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale von Detektionskanälen gewichtet werden, indem sie mit  
einer Wichtungskurve multipliziert werden, ein Summensignal erzeugt wird,  
indem die Summe der berücksichtigten Kanäle bestimmt wird und ein  
Positionssignal erzeugt wird indem die Summe der gewichteten Signale durch  
das Summensignal geteilt wird.

52.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Wichtungskurve eine Gerade ist

53.

wobei Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen  
werden und die Wichtung und Summation digital in einem Rechner erfolgt.

54.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Wichtung und Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels  
einer Widerstandskaskade erfolgt

55.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Widerstände einstellbar sind

56.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Wichtungskurve einstellbar ist

57.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei das Positionssignal und das Summensignal analog ermittelt, gewandelt  
und digital ausgelesen werden

58.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei ein oberes und in unteres Signal, die der Summe der mit  
gegenläufigen Wichtungskurven gewichteten Signale der Einzelkanäle  
entsprechen, ausgelesen, digital gewandelt und dem Rechner zugeführt  
werden.

59.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei das Positionssignal und das Summensignal zur Generierung eines  
Bildes verwendet werden

60.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird

61.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt

62.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei das Positionssignal und das Summensignal mit einer lookup Tabelle  
kombiniert werden

63:

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe  
und / oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt

64.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des  
gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer

Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine  
Veränderung der Betriebsweiser des Detektionskanals erfolgt

65.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen  
Detektionskanals erfolgt.

66.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs  
erfolgt

67.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer  
Integratorschaltung generiert werden

68.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und  
anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

69.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei  
die Photonenzählung zeitkorreliert erfolgt

70.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Erfassung von Ein-und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch  
entangled photon angeregter Fluoreszenz.

71.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening , wobei die Probe vorzugsweise ein Mikrotiterplatte ist

72.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Mikroskop

73.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

74.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in einem Fluoreszenzkorrierten Spektroskop.

75.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels konfokaler Detektion

76.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung

77.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

78.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scantisch

79.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels nichtkonfokaler Detektion

80.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einer scannenden Anordnung

81.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit descannter Detektion

82.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

83.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Punktabbildung

84.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht descannter Detektion

85.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

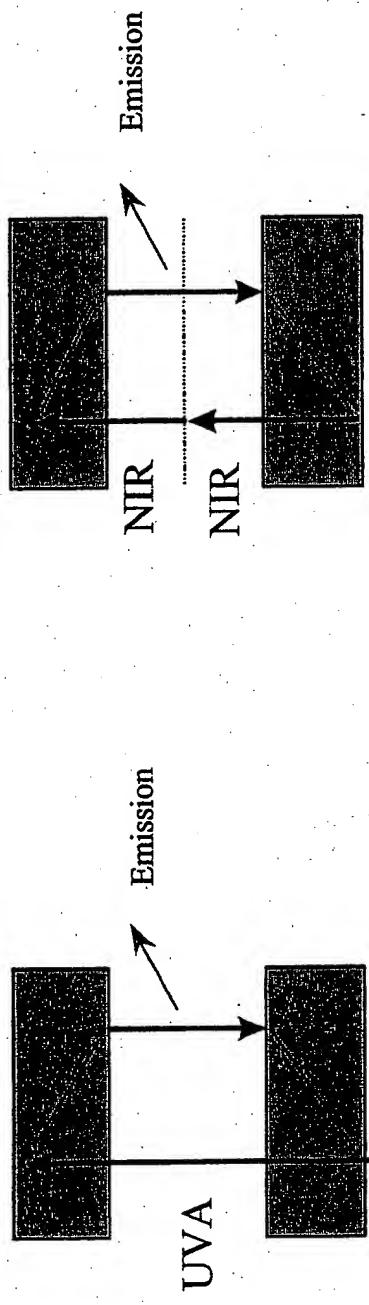
86.  
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-  
oder Hellfeldabbildung

87.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

Figure: 1  
a.) Einphotonen-Absorption, b) Mehrphotonen-Absorption

b.)  
a.)



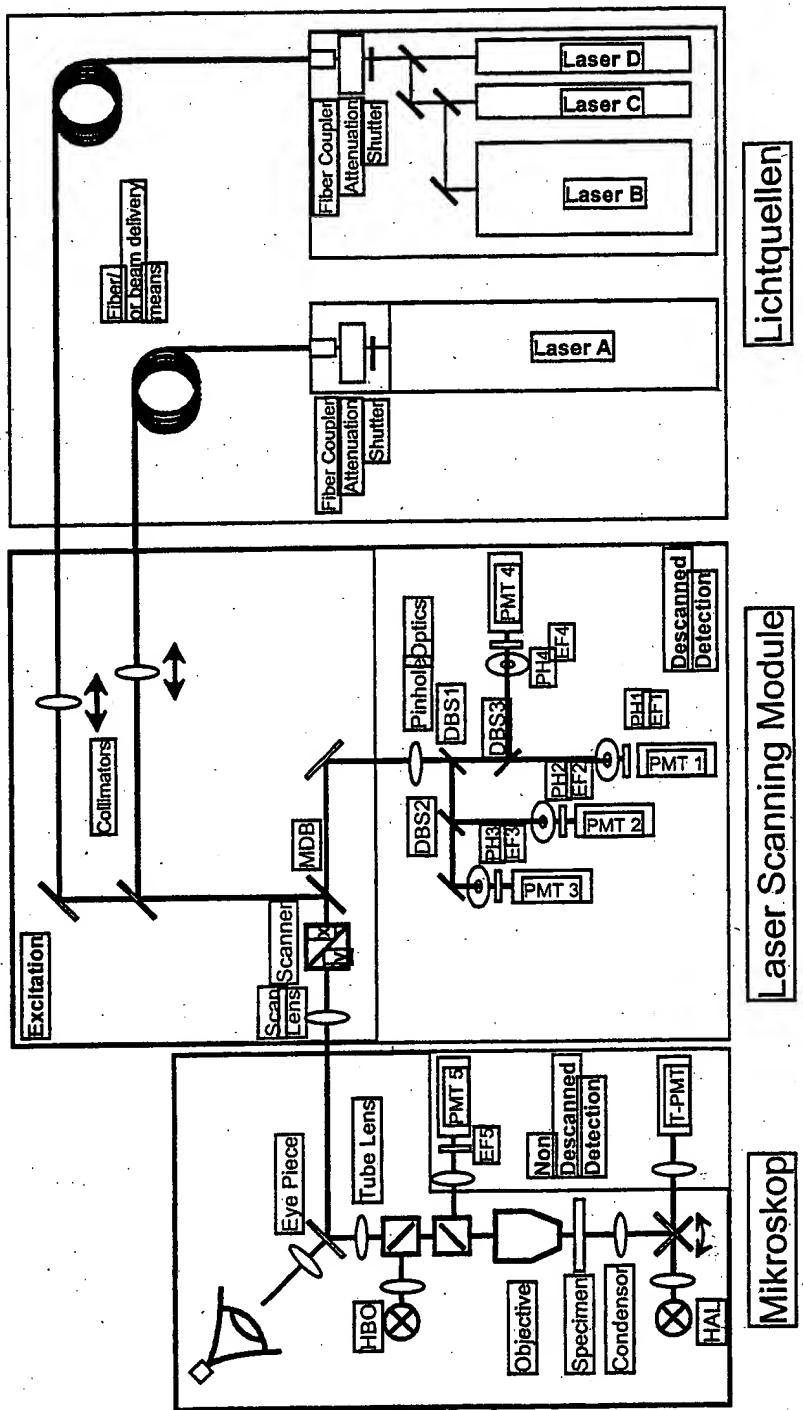
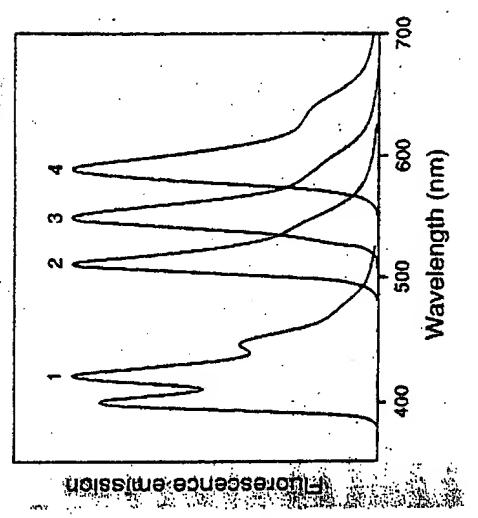
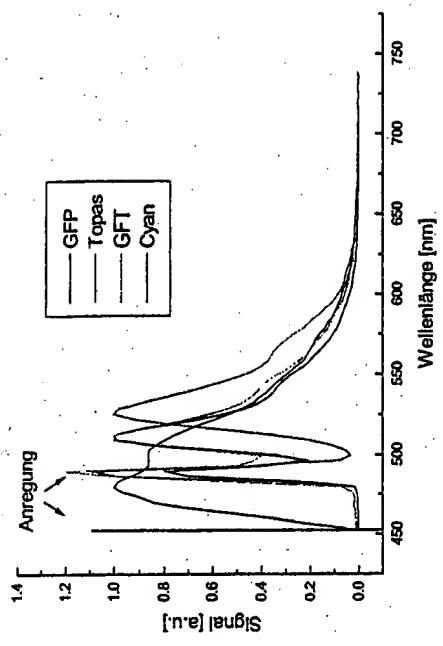


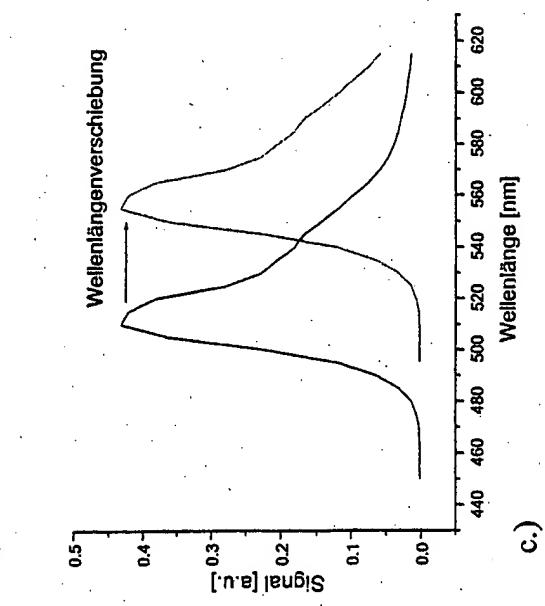
Figure: 2  
Aufbau LSM (Stand der Technik)



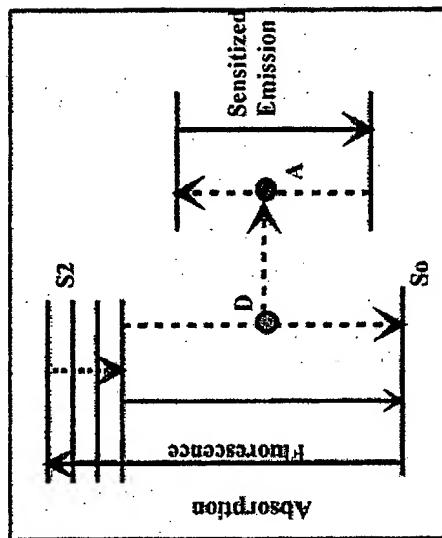
a.)



b.)



c.)



d.)

Figure: 3

Typische Spektren a.) Farbstoffe, b.) fluoreszierende Proteine  
c.) Wellenlängenverschiebung in Abh. von der Umgebung, d.) FRET

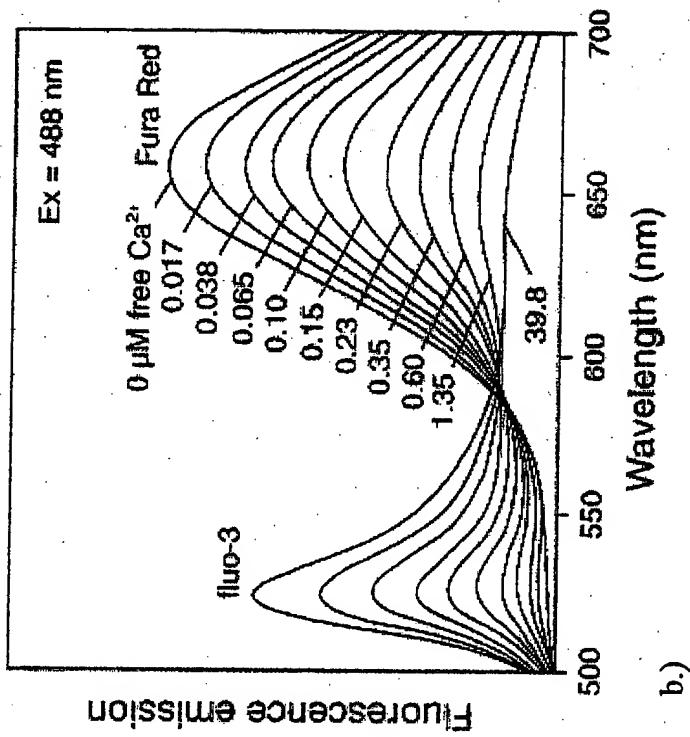
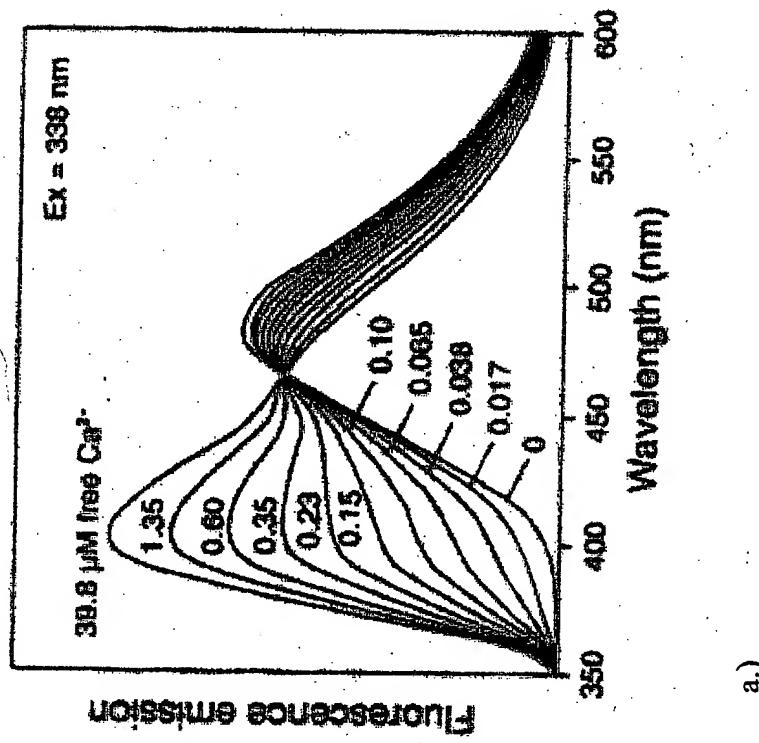


Figure: 4

Typische Spektren zu ratiometrischen Messungen  
a.) ein Farbstoff mit Emissionsratio, b.) 2 Farbstoffe mit Ionenabh. Signalen

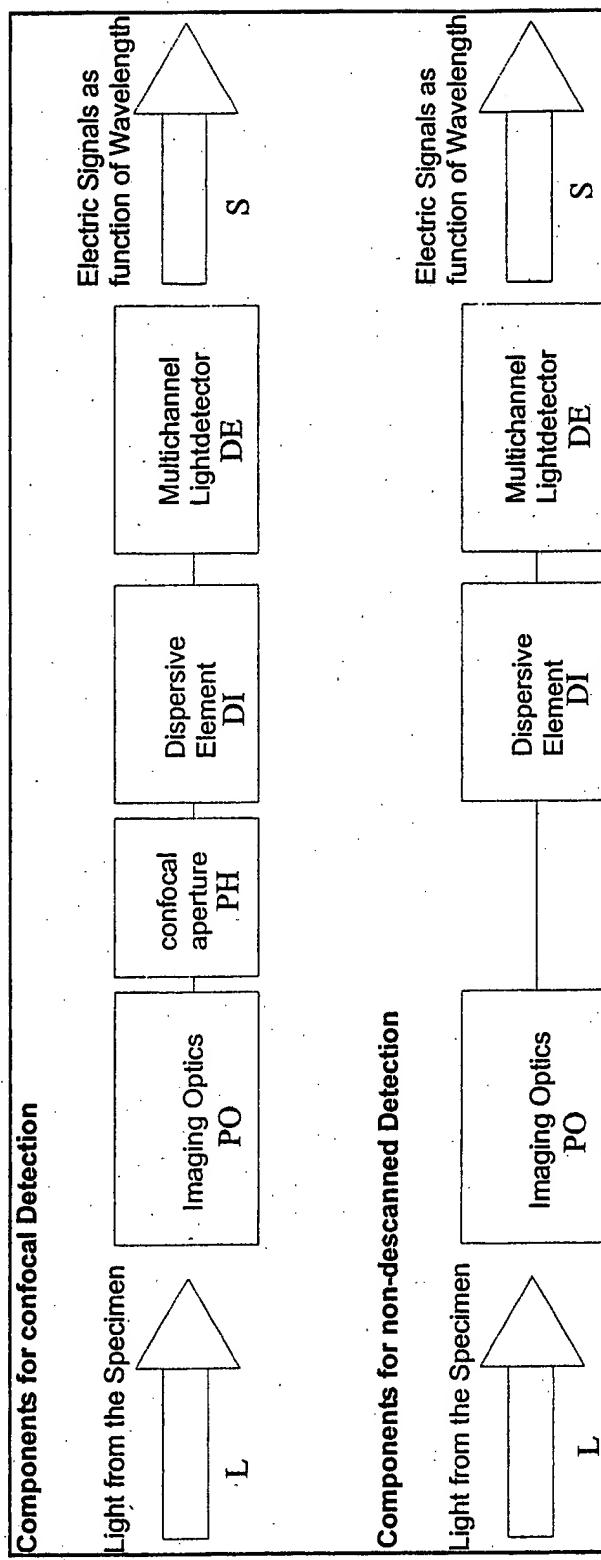


Figure: 5  
Blockschaubild Aufbau Detektoreinheit / Optik

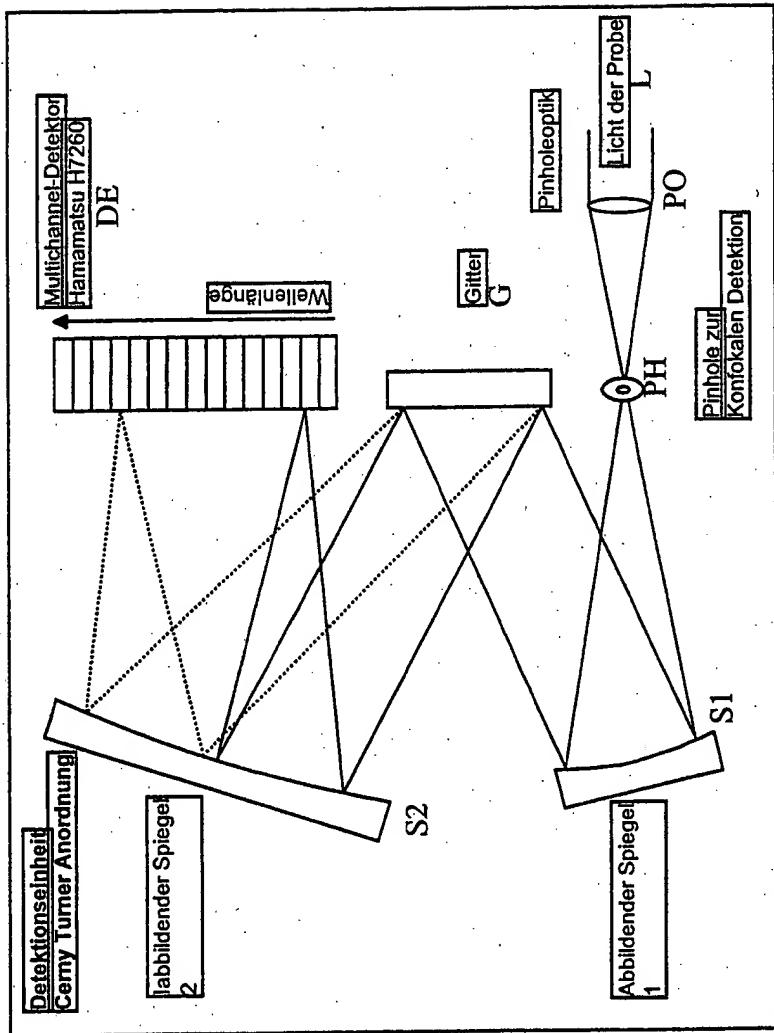


Figure: 6  
Beispiel Aufbau Detektoreinheit / Optik

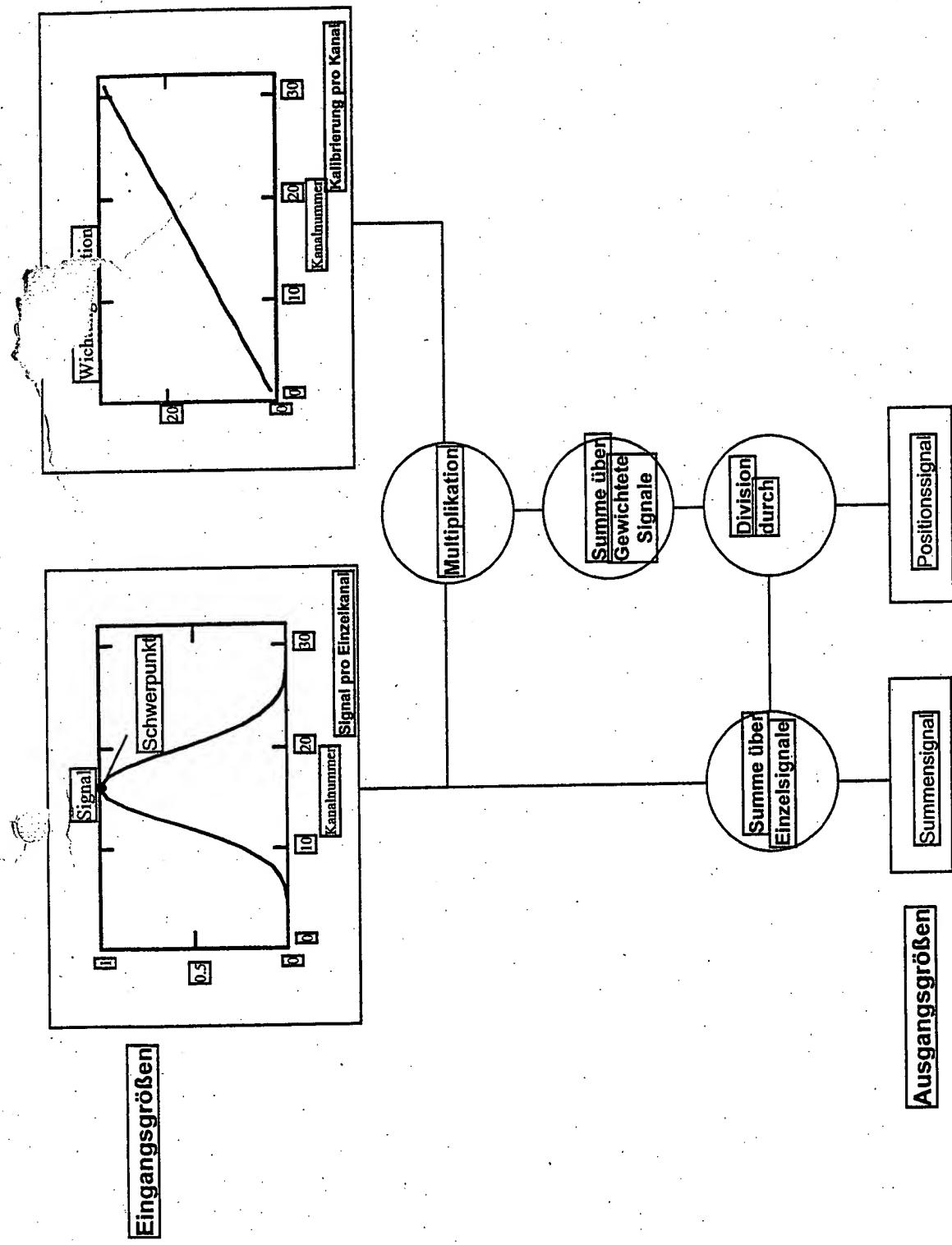
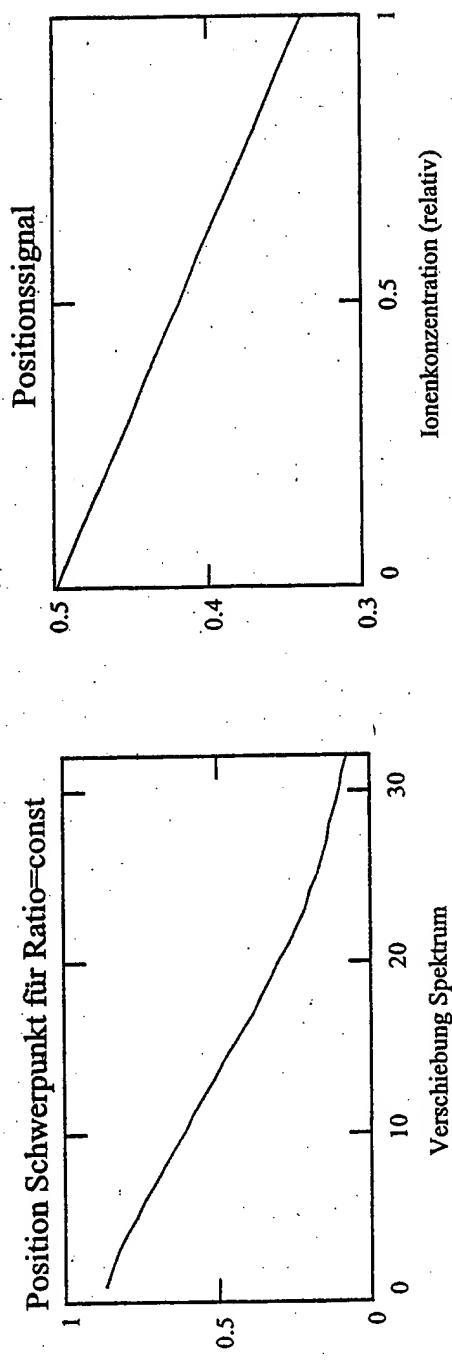


Figure: 7

Algorithmus zur Bestimmung der Position des Emissionspektrums

Figure: 8  
 Typischer Verlauf des Positionssignales in Abh. von a.) Lage des Emissionspektrums, b.) der Ionenkonzentration

a.) b.)



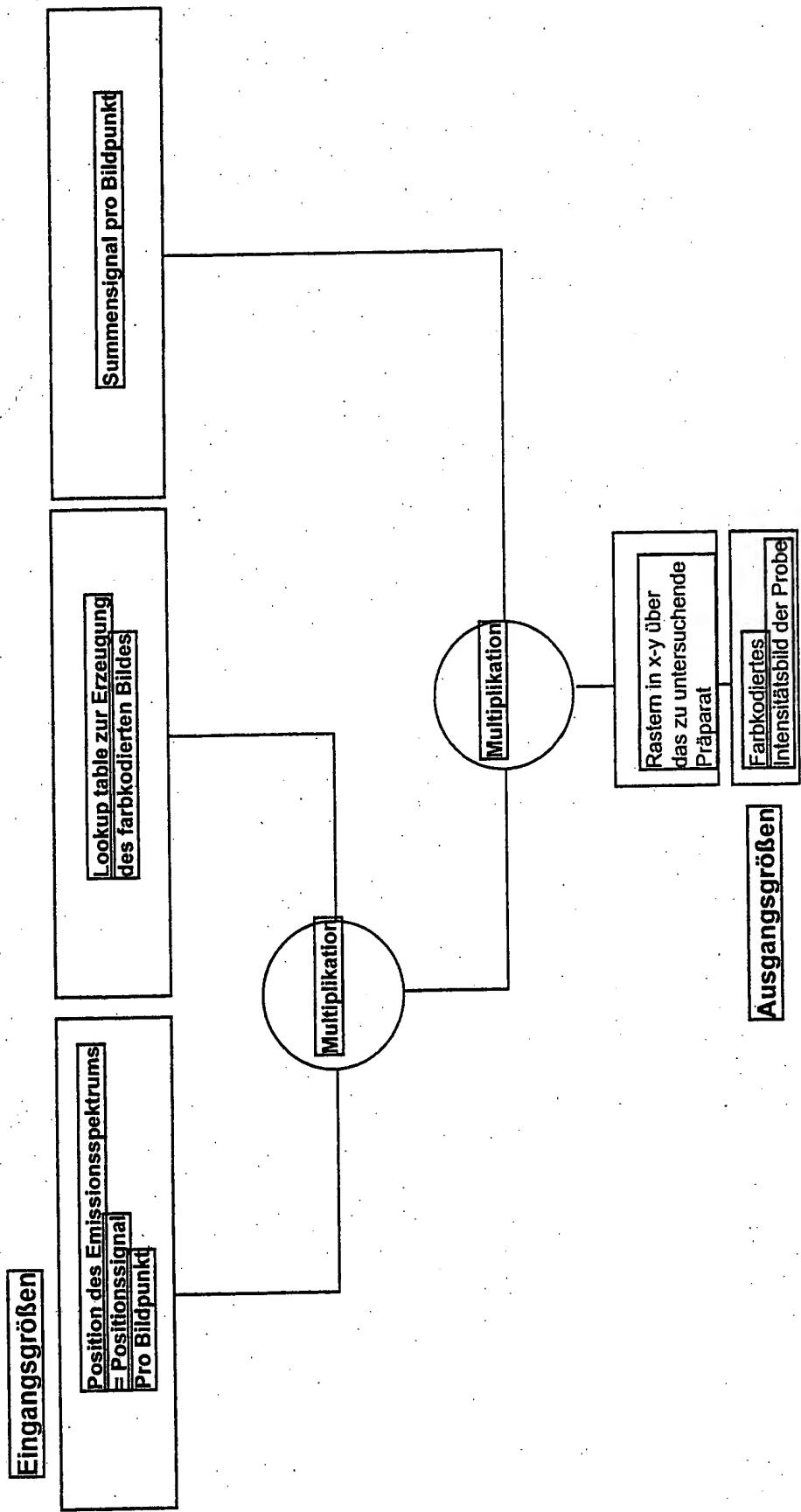


Figure: 9

Algorithmus zur Erzeugung der farbkodierten Intensitätsbilder bei Verwendung mehrerer Farbstoffe

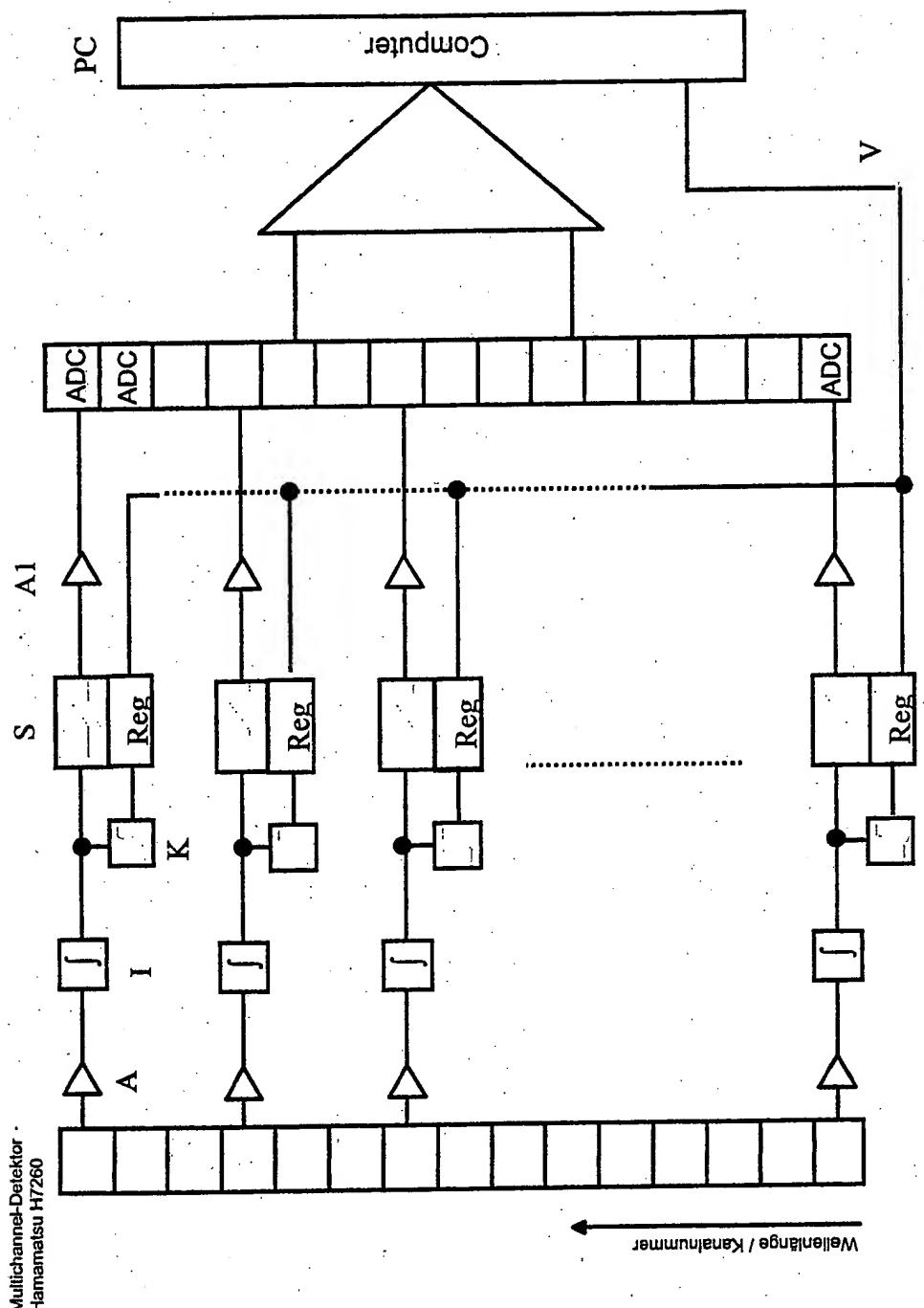


Figure: 10

Beispiel Aufbau der Elektronik zur digitalen Auswertung

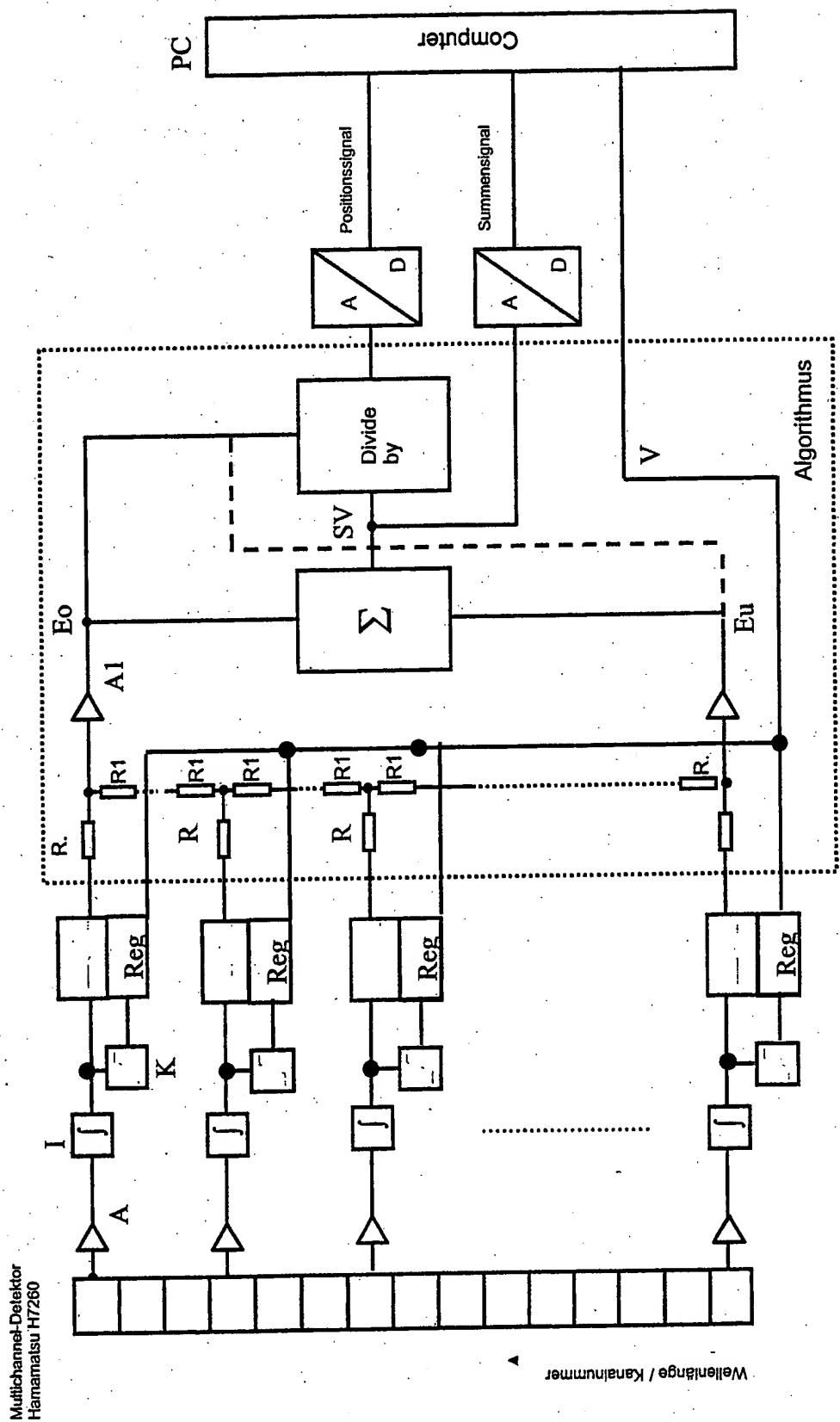
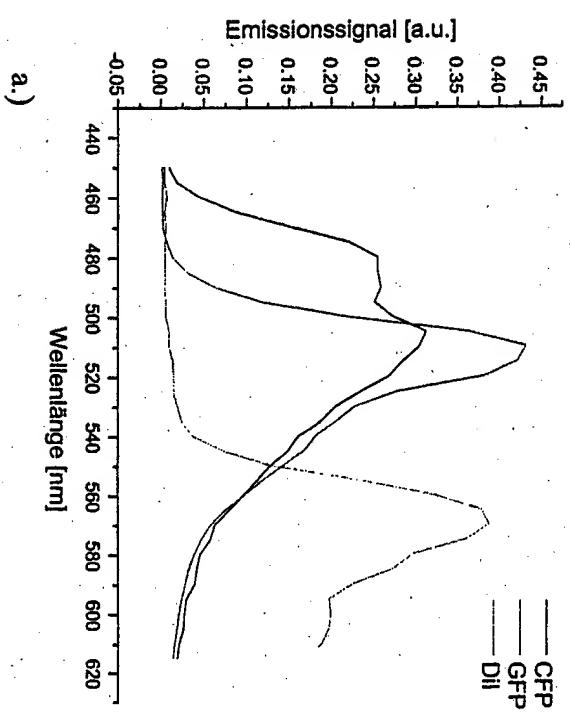
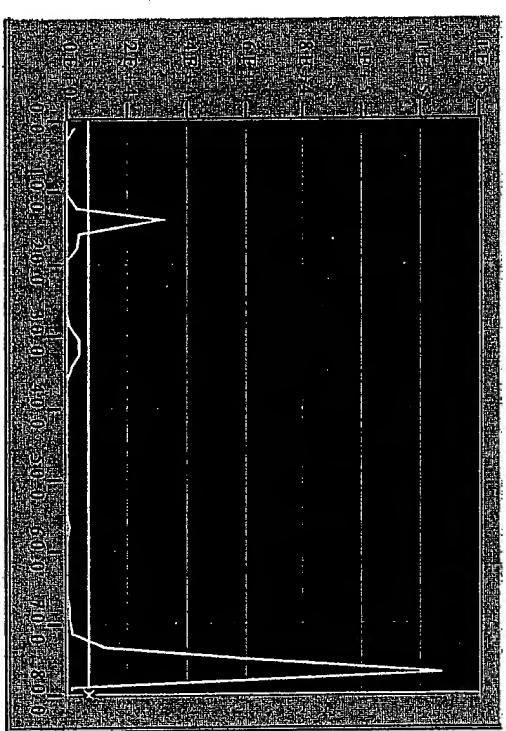


Figure: 11

Beispiel Aufbau der Elektronik zur analogen Signalauswertung

### Histogramm über 512 x 512 Bild

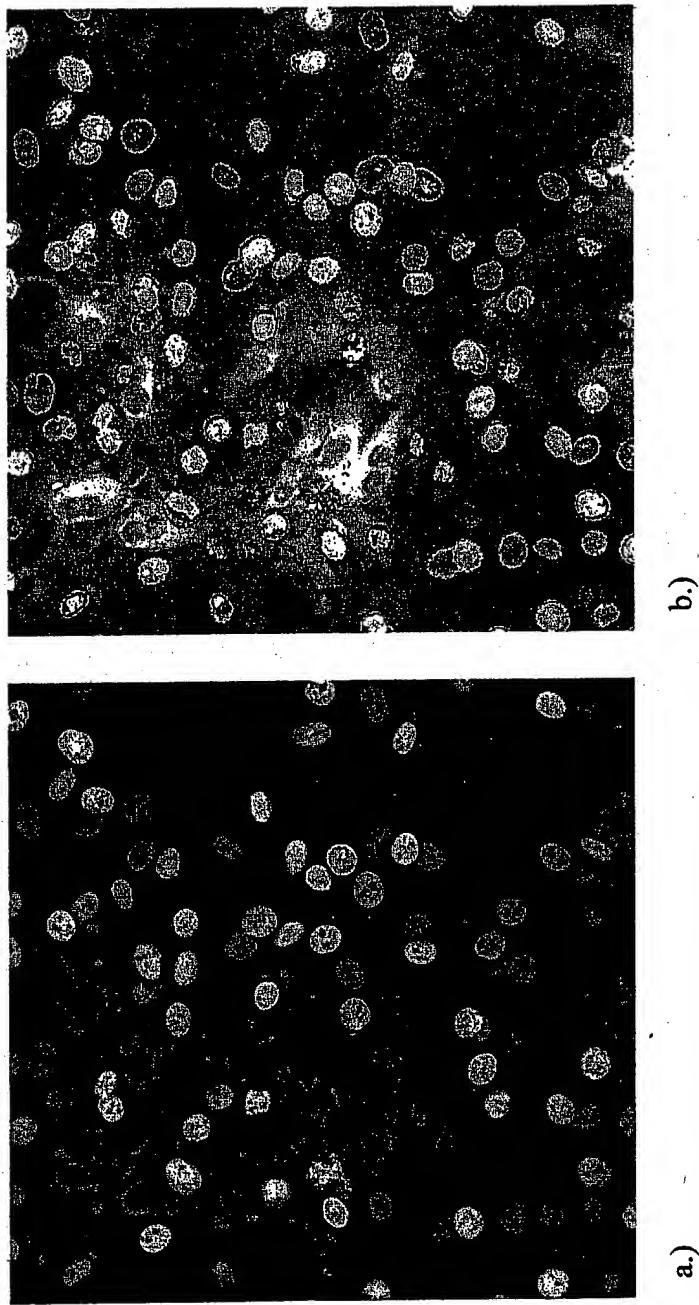


b.)

Figure: 12

a.) Farbstoffspektren, b.) Histogramm der Verschiebung der Emissionsspektren für die in a.) dargestellten Farbstoffe

Figure: 13  
Experiment zur Trennung von Farbstoffen a.) Summen-Intensitätsbild, b.) Bild der Wellenlängenverschiebung



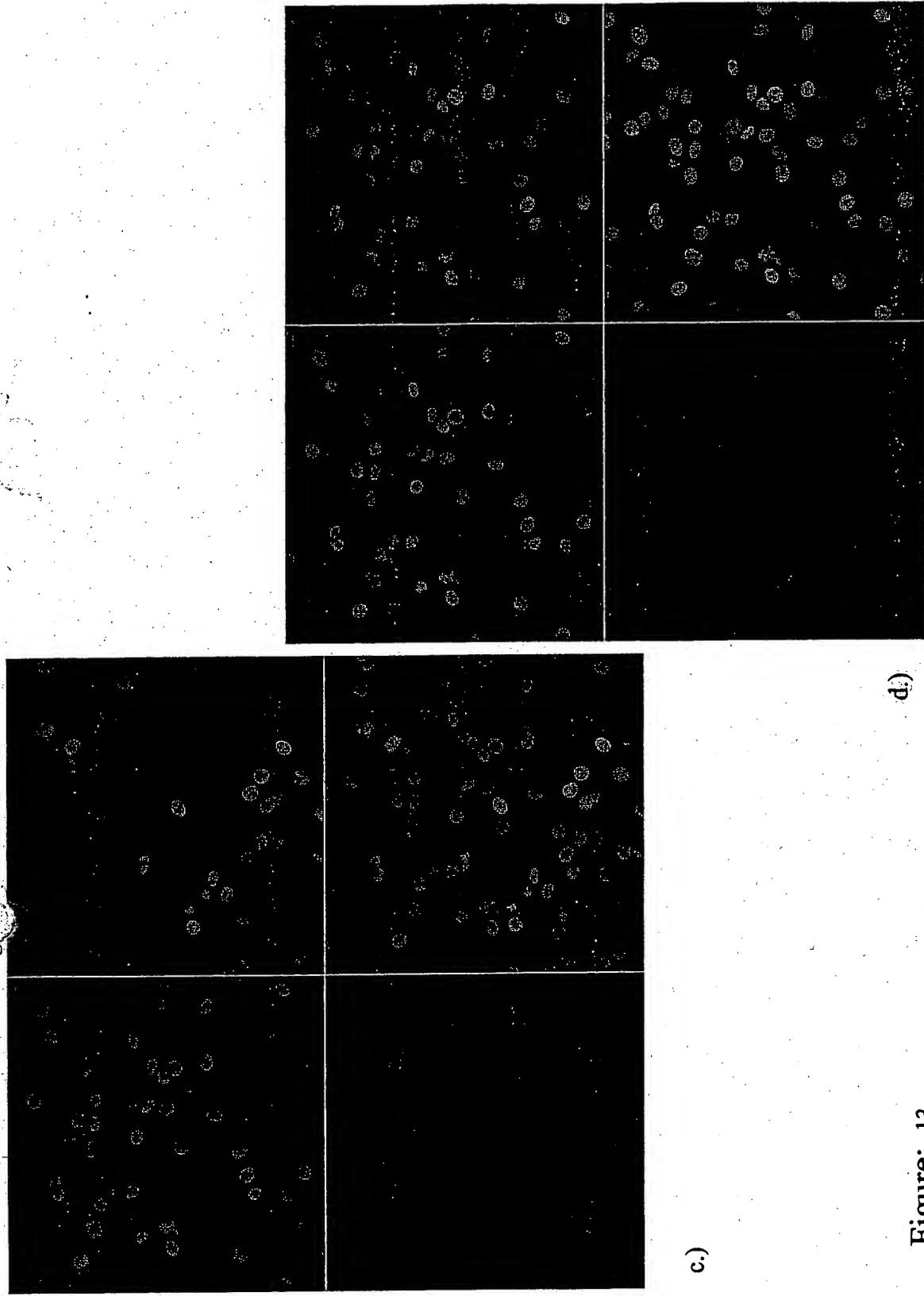


Figure: 13

c.) Entfaltetes Intensitätsbild, d.) Intensitätsbild mit herkömmlicher Detektion nach dem Stand der Technik